

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-139470
(43)Date of publication of application : 23.05.2000

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C07K 14/715
C07K 16/28
C12N 1/15
C12N 1/19
C12N 1/21
C12N 5/10
C12P 21/02
C12P 21/08
C12Q 1/68
G01N 33/53
G01N 33/566
G01N 33/574
G01N 33/577
// (C12N 15/09
C12R 1:91)

(21)Application number : 10-325380
(22)Date of filing : 16.11.1998

(71)Applicant : AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL
(72)Inventor : TANAKA MANAMI
TANAKA ASAO

(54) HUMAN-DERIVED BRADEION PROTEIN, DNA ENCODING THE SAME AND THEIR USE**(57)Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain Bradeion protein useful for detection of cancers or the like, comprising a membrane protein having a characteristic structure in its interleukin receptor, capable of inducing cell deaths in undifferentiated human cultured nerve cells and adapted to be expressed in each cell strain of carcinoma of the colon and rectum and of carcinoma cutaneum.

SOLUTION: This membrane protein is a new human-derived Bradeion protein (analog) with the following characteristics: having a specific structure in its interleukin receptor covering the transmembrane site (single time) when using hydropathy analysis depending on Kyte-Doolittle method; strongly expressed in human adult brains; expressed in hearts in $\leq 10\%$ expression level of the brains; never expressed in the other organs and human embryos; inducing cell deaths when excessively expressed in undifferentiated human cultured nerve cells; inducing the aging and stop of cell division when excessively expressed in cultured human healthy cells; forming intracellular agglutinations via existing in cytoplasm in the process of cell deaths and accumulating around mitochondria; and being specifically expressed in each cell strain of carcinoma of colon and rectum and of carcinoma cutaneum.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.11.1998
[Date of sending the examiner's decision of rejection]
[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]
[Date of final disposal for application]
[Patent number] 3141107
[Date of registration] 22.12.2000
[Number of appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-139470

(P2000-139470A)

(43) 公開日 平成12年5月23日 (2000. 5. 23)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/715		C 0 7 K 14/715	4 B 0 6 3
16/28		16/28	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
1/19		1/19	4 H 0 4 5
審査請求 有 請求項の数15 O L (全 25 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-325380

(22) 出願日 平成10年11月16日 (1998. 11. 16)

(71) 出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 田中 真奈実

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院 生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 田中 朝雄

神奈川県伊勢原市上粕屋246 東海大学職
員住宅401号

(74) 指定代理人 220000404

工業技術院生命工学工業技術研究所長

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト由来ブラディオン蛋白質、それをコードするDNA及びそれらの使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 脳神経細胞の長期生存に大きな役割を担っている蛋白質、それをコードするDNAを見出すこと。

【解決手段】 以下の性質：(1) 膜蛋白質である、(2) K y t e e - D o o l i t t l e 法によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分(一回)も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有する、(3) ヒト成人脳に強度の発現が認められ、心臓において脳の10%以下の発現が認められ、その他の臓器やヒト胎児には発現されない、(4) 未分化のヒト培養神経細胞に過剰発現させると、細胞死を誘導する、(5) 培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導する、及び(6) ヒト大腸癌細胞株及びヒト皮膚癌細胞株で特異的に発現される、を有するヒト由来のブラディオン (B r a d e i o n) 蛋白質又はその類似体、それに対する抗体、それをコードするDNA又はその断片の使用。

Case No.	Age/sex	Hist. type	Dukes' stage	K-ras (codon 12)	Bradeion RT-PCR hybridization	In situ
T1	81/M	Ad(mod)	A	-	ND	+
T2	51/F	Ad(mod)	B	-	ND	+
T3	71/M	Ad(mod)	C	-	+	+
T4	70/M	Ad(mod)	C	-	ND	+
T5	40/M	Ad(mod)	C	-	ND	+
T6	75/M	Ad(mod)	A	-	ND	+
T7	71/F	Ad(well)	B	GTT	+	+
T8	56/M	Ad(well)	B	-	ND	+
T9	70/F	Ad(well)	C	GCT	+	+
T10	54/M	Ad(well)	C	GAT	ND	+
T11	73/F	MM	A	-	ND	+
T12	63/M	Muc	A	-	+	+
T13	68/F	Muc	C	GAT	+	+
N1	54/M	normal	-	-	-	-
N2	81/M	normal	-	-	-	-

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の性質：

(1) 膜蛋白質である、(2) K y t e e - D o o l i t t l e 法によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分(一回)も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有する、(3) ヒト成人脳に強度の発現が認められ、心臓において脳の10%以下の発現が認められ、その他の臓器やヒト胎児には発現されない、(4) 未分化のヒト培養神経細胞に過剰発現させると、細胞死を誘導する、(5) 培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導する、(6) 細胞死に至る過程で細胞質に存在して細胞内凝集体を形成し、24時間以内でミトコンドリアに集積する、及び(7) ヒト大腸癌細胞株又は皮膚癌細胞株で特異的に発現されるを有するヒト由来ブラディオオン蛋白質又はその類似体。

【請求項 2】 培養癌細胞にブラディオオン蛋白質又はその類似体をコードする DNA を遺伝子導入すると細胞死を誘発する、請求項 1 に記載のブラディオオン蛋白質又はその類似体。

【請求項 3】 配列表の配列番号 2 に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する、請求項 1 又は 2 に記載のブラディオオン蛋白質又はその類似体。

【請求項 4】 配列表の配列番号 4 に示すアミノ酸配列、又は該アミノ酸配列において少なくとも 1 個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載のブラディオオン蛋白質又はその類似体。

【請求項 5】 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のブラディオオン蛋白質もしくはその類似体をコードする塩基配列を含む DNA 又はその断片。

【請求項 6】 配列表の配列番号 1 の 129 位から 1943 位までの塩基配列、又は該塩基配列の 15 個以上の連続するヌクレオチドからなる配列を有する、請求項 5 に記載の DNA 又はその断片。

【請求項 7】 配列表の配列番号 3 の 129 位から 1562 位までの塩基配列、又は該塩基配列の 15 個以上の連続するヌクレオチドからなる配列を有する、請求項 5 に記載の DNA 又はその断片。

【請求項 8】 配列表の配列番号 1 (129 ～ 1943 位) に示す塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、請求項 5 に記載の DNA。

【請求項 9】 配列表の配列番号 3 (129 ～ 1562 位) に示す塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、請求項 5 に記載の DNA。

【請求項 10】 請求項 5 ～ 9 のいずれかに記載の DNA 又はその断片を含むベクター。

【請求項 11】 請求項 10 に記載のベクターで形質転換若しくはトランスフェクションされた宿主細胞。

【請求項 12】 原核又は真核細胞である、請求項 11 に記載の宿主細胞。

【請求項 13】 請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載のブラディオオン又はその類似体と免疫反応性である抗体。

【請求項 14】 癌の検出における、請求項 5 ～ 9 のいずれかに記載の DNA もしくはその断片又は請求項 13 に記載の抗体の使用。

【請求項 15】 癌がヒト大腸癌またはヒト皮膚癌である、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】 検出がハイブリダイゼーション又はイムノアッセイによって行われる、請求項 14 又は 15 に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、脳神経細胞の長期生存に係わる蛋白質、それをコードする DNA 及びそれらの使用に関する。具体的には、本発明は、ヒト由来ブラディオオン (B r a d e i o n) 蛋白質又はその誘導体、それをコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターで形質転換若しくはトランスフェクションされた宿主細胞、該蛋白質又はその誘導体と免疫反応性である抗体、並びに癌の検出における該 DNA 又は抗体の使用に関する。

【0002】

【従来の技術】脳神経細胞 (ニューロン) は、高等生物個体の生存を司る主要素子であり、生まれてからは一切分裂せず、刻々脱落・壊死していくのみである。このニューロンの脱落は、正常状態でも起こるが、遺伝病・脳虚血やてんかん重積状態、低栄養・低酸素条件で非常に加速させる。老化に伴う脳神経障害 (ほけ等) は、これらの集積による機能性ニューロンの絶対量の不足によるものであり、この脱落状態のモニタリング、脱落制御、ひいてはニューロンの機能再生が高齢化におけるもっとも緊急な課題であると考えられる。

【0003】脳神経細胞は、発生過程における分化誘導期を過ぎると、その後分裂せず、個体寿命が尽きるまでその機能を維持したまま (あるいは緩やかな機能減退とともに) 生存し、特異な分裂停止機構及び機能維持機構が存在すると推測されるが、未だその機構解明に至っていない。中枢神経系は、未解明の蛋白質・シグナル伝達物質 (刺激物質としても受容体としても) の宝庫であり、現在解明を待つ物質が大量に存在する。特に、脳と特異的シグナル伝達に係わる刺激物質、その受容体が多数存在し、その全貌は未だ明らかになっていない。

【0004】このように重要な脳神経細胞の生存制御因子に対して、多数の研究が世界レベルで展開されたが、未だその本体の物質的・分子的解明に至っておらず、解析技法の開発から着手されなくてはならなかった。最

近、米国テキサス大学のハワードヒュージス財団認定医学研究所の柳沢正史博士らのグループが、このような神経ペプチドとその受容体を培養細胞を用いて無作為に探索する技術開発に成功し、その例として視床下部の食欲刺激中枢に直接結合・刺激する物質（オレキシン）の発見とその受容体の機能解明に成功した（Cell, 92, 573-585 (1998)）。しかし、このような系統だった物質探索の試みはまれであり、脳特異的シグナル伝達に係わる刺激物質、その受容体の解明については未だ十分に行われていないのが現状であった。このような状況にあって、本発明者は、改良型発現遺伝子（cDNA）ライブラリーの構築、系統的スクリーニング技術を開発し、それにより脳神経細胞特異的遺伝子の抽出・選別に成功し、本発明を完成した。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、脳神経細胞の長期生存に関与するブラディオン蛋白質、それをコードするDNAを提供することである。本発明の別の目的は、該DNAを含むベクター、このベクターで形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞を提供することである。本発明のさらに別の目的は、該DNA又は、該蛋白質に対する抗体を癌の検出に使用することである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、以下の性質：（1）膜蛋白質である、（2）Kyte-Doolittle法によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分（一回）も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有する、（3）ヒト成人脳に強度の発現が認められ、心臓において脳の10%以下の発現が認められ、その他の臓器やヒト胎児には発現されない、（4）未分化のヒト培養神経細胞に過剰発現させると、細胞死を誘導する、（5）培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導する、（6）細胞死に至る過程で細胞質に存在して細胞内凝集体を形成し、24時間以内でミトコンドリアに集積する、及び（7）ヒト大腸癌細胞株及びヒト皮膚癌細胞株で特異的に発現されるを有するヒト由来のブラディオン蛋白質又はその類似体を提供する。

【0007】本発明の蛋白質には、配列表の配列番号2又は4に示すアミノ酸配列からなり、それぞれ α ブラディオン、 β ブラディオンと称する蛋白質が包含される。これらの蛋白質は転写過程での選択的スプライシングによる発現産物であると考えられる。上記の性質に加えて、 α ブラディオンの場合、培養癌細胞に α ブラディオン又はその類似体をコードするDNAを遺伝子導入すると細胞死を誘発するという性質を示すが、これに反して β ブラディオンの場合そのような細胞死は観察されない。

【0008】本明細書中「類似体」とは、ヒト由来ブラ

ディオンと実質的に同等の性質、特に上記性質中少なくとも（1）、（2）、（3）、（6）、（7）の性質をもつもの、或いは、配列番号2又は4に示すアミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものである。類似体は、配列番号2又は4に示すアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上の相同性を有するのが望ましい。本発明の類似体には、ヒト由来ブラディオン蛋白質のアミノ酸レベルでの改変体もしくは変異体、ヒト以外の哺乳類由来の同等の性質をもつブラディオントタンパク質が包含される。例えばマウス脳では、ヒト由来の2種のタイプのうち β 型のみが見出されたが、ヒト由来 β ブラディオンとの相同性は94%であった。本発明の類似体は、ヒトブラディオンの生物学的活性を損なわない範囲で部位特異的変異誘発法等の人工的改変法を用いてDNA組換え技術によって得ることができ、糖鎖は含んでも含まなくてもよい。また、ポリエチレングリコール等の水溶性ポリマーによって化学的に修飾されていてもよい。本発明はまた、上記に定義したブラディオン蛋白質又はその類似体をコードする塩基配列を含むDNA又はその断片を提供する。

【0009】そのようなDNA又はその断片の具体例として、配列番号1の129位から1943位までの塩基配列からなるDNA（即ちヒト α ブラディオンをコードするDNA）又は該塩基配列の15個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上の連続するヌクレオチドからなる配列を有するDNA断片、或いは配列番号1に示す全塩基配列からなるDNA、並びに、配列番号3の129位から1562位までの塩基配列からなるDNA（即ちヒト β ブラディオンをコードするDNA）又は該塩基配列の15個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上の連続するヌクレオチドからなる配列を有するDNA断片、或いは配列番号3に示す全塩基配列からなるDNAを挙げることができる。さらに、これらのDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズすることができるDNAも本発明に包含されるものとする。ここでストリンジントな条件とは、配列番号1（129～1943位）又は配列番号3（129～1562位）に示す塩基配列と90%以上の相同性、好ましくは95%以上の相同性、より好ましくは97%以上の相同性が配列間に存在するときのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。通常、完全ハイブリッドの融解温度（ T_m ）より約5℃～約30℃、好ましくは約10℃～約25℃低い温度でハイブリダイゼーションが起こる場合をいう。ストリンジントな条件については、J. Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、特に11.45節“Condition

ns for Hybridization of Oligonucleotide Probes”に記載されており、ここに記載の条件を使用し得る。本発明のDNA又はその断片は、ブラディオ蛋白質の発現用だけでなく、ハイブリダイゼーション用のプローブとして、またPCR用のプライマーとしても使用することができる。

【0010】本発明はさらに、ブラディオ蛋白質をコードするDNAを含むベクターを提供する。ベクターは、該DNAが発現可能なように少なくともプロモーターを含有しており、その他に複製開始点、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終結因子（ターミネーター）、選択マーカー、RNAスプライス部位、ポリアデニル化シグナル等の要素を含むことができる。本発明はさらにまた、そのようなベクターで形質転換若しくはトランスフェクションされた宿主細胞を提供する。宿主細胞は原核細胞又は真核細胞のいずれでもよいが、好ましくは真核細胞、より好ましくは哺乳類細胞、特にヒト細胞株である。

【0011】本発明はまた、上記定義のブラディオ蛋白質又はその類似体と免疫反応性である抗体を提供する。抗体は、ブラディオ蛋白質又はその類似体と特異的に免疫反応するものが好ましく、ポリクローナル又はモノクローナル抗体のいずれでもよい。本発明はさらに、癌の検出における、上記定義のDNAもしくはその断片又は上記定義の抗体の使用を提供する。ここで、癌は好ましくは、ヒト大腸癌またはヒト皮膚癌である。また、検出はハイブリダイゼーション又はイムノアッセイによって行うことができる。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明のブラディオ蛋白質をコードするcDNAは、以下のような方法によって得ることができる。まず、脳組織をグアニジンイソチオシアネートを含んだフェノール又はフェノールクロロフォルム溶液でホモジナイズし、高速遠心により水層と有機層に分離した後、水層に含まれる全RNAをイソプロパノールに加え沈殿させて回収するか、或いはショ糖もしくはセシウムクロライド密度勾配遠心法により回収する。この全RNAをオリゴ（dT）セルロースクロマトグラフィーにかけてmRNA（即ち、poly（A）RNA）を精製する。

【0013】次に、mRNAから逆転写酵素の存在下にcDNAを合成し、ファージ若しくはプラスミドベクターに連結可能なように適当な制限酵素部位を作り、これを同様の制限酵素部位をもつファージ若しくはプラスミドベクターに連結し、このようにして得られたベクターで大腸菌を形質転換又はトランスフェクションしてcDNAライブラリーを作製する。

【0014】クローン化cDNAライブラリーには、目的のDNA以外に種々の異なった情報をもったDNA断片が挿入されているため、目的のDNAを選抜する必要

がある。選抜方法として、例えばブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション等の方法を用いることができる。この方法によれば、寒天上に形成されたブランク（ファージベクターの場合）又はコロニー（プラスミドベクターの場合）をニトロセルロース膜若しくはナイロン膜に転写し、アルカリ溶液で処理した後、これに目的のDNAとハイブリダイズ可能な放射性（³²P）若しくは蛍光標識DNAプローブを添加し結合させ、X線フィルム上で感光することにより、目的のDNAを含有するブランク又はクローンを検出し回収する。或いは、得られたクローン群を、イソプロピルー１ーチオーβ-D-ガラクトシド（IPTGという）等の誘導物質により蛋白質を強制発現させ、これをナイロン膜若しくはセルロース膜に転写し、目的蛋白質に対する特異抗体を用いて免疫学的に対応クローンを選抜することも可能である。

【0015】プローブに対して陽性反応を示したブランク又はクローンから回収した目的のcDNAについて、マキサム・ギルバート（Maxam-Gilbert）法又はサンガー・クルソン（Sanger-Coulson）法により配列決定する。クローニング法および配列決定については、例えばSambrookら、Molecular Cloning（上掲）、Ausubelら、Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Company Assoc. and John Wiley Interscience, NY, 1992等に記載される方法を参照することができる。

【0016】具体的には、後述の実施例に記載するように、ヒト成人脳のcDNAライブラリーを構築し、その陽性クローンから本発明のブラディオ蛋白質をコードするcDNAを取得した。配列分析の結果、選択的スライシングによるものと推定される2種のα型、β型のブラディオ遺伝子が見出された。これらの塩基配列をそれぞれ配列番号1及び配列番号3に示したが、コーディング領域はそれぞれ129位～1943位、129位～1562位であった。また、塩基配列から判明したα型、β型のブラディオ蛋白質はそれぞれ配列番号2及び配列番号4に示されるアミノ酸配列を有することがわかった。即ち、α型ブラディオDNAは1815個のヌクレオチドからなり、605個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしている。また、β型ブラディオDNAは1434個のヌクレオチドからなり、478個のアミノ酸からなる蛋白質をコードしている。但し、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列中の1位のMetは欠失していてもよい。これらの配列をジーンバンクで精査したところ、α型、β型ともに新規の遺伝子及び蛋白質であることが判明した。

【0017】α及びβブラディオ蛋白質は、Kyte-Doolittle法（J. Mol. Biol., 1

57 (1):105-132, 1982)によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分(一回)も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有することがわかった。すなわち、細胞内シグナル伝達機構に関わると予想される膜貫通型受容体構造を有していることが示された。さらに、 α 型、 β 型という2種の発現様式があり、一方は多種生物にも恒存的であるところは、癌抑制遺伝子p53/p73の關係に類似している。また、細胞内凝集体形成は、トリプレットリピート遺伝子発現物質によるヒト神経退行性変異に見られるものと極めて大きな相同性を示す(Igarashiら, Nature Genetics, 111-117, 1998; Martindaleら, Nature Genetics, 150-154, 1998)ことから、この遺伝子正常発現状態では発生・分化以降の脳神経細胞におけるヒト特異的神経細胞分裂停止及び機能維持に大きく関わっていると考えられる。

【0018】本発明のヒト由来ブラディオオン蛋白質又はその類似体は例えば以下のように遺伝子組換え技術を利用して得ることができる。配列番号1又は3に示される塩基配列或いは配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列に基いて、遺伝暗号の縮重を考慮しつつ、任意の連続する15以上、好ましくは約20〜約50個の塩基からなるハイブリダイゼーションプローブを作製し、これを用いてヒト又はヒト以外の哺乳類の脳組織に由来するゲノムDNAライブラリー又はcDNAライブラリーから、ブラディオオン蛋白質をコードするDNAをスクリーニングすることができる。ライブラリーは、例えば λ ZA PII、pBluescript(登録商標)クローニングベクター

(Stratagene Cloning Systems)などの商業的に入手可能なベクターを用いて作製することが可能である。ブランクハイブリダイゼーション又はコロニーハイブリダイゼーションによって目的のDNAを含むブランク又はクローンを選択する。

【0019】或いは、配列番号1の129〜1943位又は配列番号3の129〜1562位に示される塩基配列に基いてそれに相補的な通常15〜100ヌクレオチドの連続するDNA配列をプライマーとして作製し、これを用いてヒト又は他の哺乳類の脳組織に由来するゲノムDNAライブラリー又はcDNAライブラリーについてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行なって目的のDNAを特異的に増幅することができる。PCRは例えば、変性94℃, 1分; アニーリング57℃, 2分; 伸長70℃, 3分を1サイクルとして20サイクル以上、好ましくは30サイクル以上の条件を使用できる。PCRについては例えば、蛋白核酸酵素「PCR法最前線—基礎技術から応用まで—」第4巻, 第5号, 1996年4月号増刊, 共立出版に記載されている技術を利用できる。目的のDNAをクローン化又は増幅した後、目的DNAを回収し、これを入手可能な適当な発現ベクターに組み込み、

さらに適当な宿主細胞に形質転換し、適当な培地中で培養、発現させ、目的蛋白質を回収、精製することができる。

【0020】本発明の類似体には、ヒト由来ブラディオオンと実質的に同等の性質、特に上記性質中少なくとも

(1)、(2)、(3)、(6)、(7)の性質をもつものか、或いは、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列において1個以上のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するものが包含される。類似体として、配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上の相同性を有するものが望ましい。このことは、ヒト α 又は β ブラディオオンと実質的に同等の生物学的活性を有するのであれば、それらのアミノ酸配列に少なくとも1個のアミノ酸の欠失、置換又は付加の改変があってもよいことを意味する。例えば部位特異的突然変異/PCR法などの周知の技術(S. N. Hoら, Gene 77, 51(1989); 西郷薫と佐野弓子共訳, CURRENT PROTOCOLS コンパクト版, 分子生物学実験プロトコルI, 1997年6月, 丸善)を用いることによって、遺伝子工学的に配列番号2又は4に示されるアミノ酸配列中に変異を導入することも可能である。置換の例としては、疎水性アミノ酸(Ala、Val、Leu、Ile等)間の置換、Ser及びThr間の置換、Asp及びGlu間の置換、Asn及びGln間の置換、Lys及びArg間の置換、Phe及びTyr間の置換が挙げられる。付加の例としては、細菌性宿主での発現産物で認められる成熟蛋白のN末端へのMetの付加、成熟型蛋白に誘導し易くするためのN末端へのHisタグやMet-Lys若しくはMet-Arg配列の付加などが挙げられる。また、生物学的活性の喪失に導かない範囲で、ブラディオオン蛋白質のカルボキシル末端又はアミノ末端側の幾つかのアミノ酸残基をトランケートすることも可能である。

【0021】さらに、遺伝子組換え技術によってブラディオオン蛋白質又はその類似体をコードするDNAを発現する際に、宿主細胞として細菌等の原核細胞を用いるときには糖鎖のない蛋白質が生成され、一方、菌類、酵母、昆虫細胞、植物細胞、哺乳類細胞などの真核細胞中で発現された場合の生成物は糖鎖をもつものが得られる可能性がある。糖鎖導入は、配列上に任意にN結合型糖鎖部位(Asn-Xaa-Thr/Ser、ここでXaaはPro以外の任意のアミノ酸である)を導入することによっても可能である。いずれにせよ、得られる類似体はヒトブラディオオンと実質的に同等の生物学的活性をもつべきである。

【0022】本発明のヒトブラディオオン蛋白質又はその類似体は、そのN末端のアミノ基又はリシンの ϵ -アミノ基にポリエチレングリコール(PEG)等の水溶性ポリマーを化学的に結合させることができる。PEG化は

生体への投与時に抗原性又は免疫原性を低減又は抑制させることが知られている。本発明はさらに、上記DNAを含む発現ベクター、及びこのベクターを用いて形質転換又はトランスフェクションされた宿主細胞を提供する。

【0023】本発明のベクターは、プラスミド、ファージ、ウイルス等の形態であり得る。例えば、細菌プラスミド（pBR322、pKC30、pCFM536など）、ファージDNA（ラムダファージなど）、酵母プラスミド（pG-1など）、哺乳類細胞用のベクターとしてのバキュロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス等のウイルスDNA、SV40とその誘導体など、宿主細胞において複製可能である限り他のいかなるベクターも用いることができる。ベクターは複製開始点、選択マーカー、プロモーターを含み、必要に応じてエンハンサー、転写終結配列（ターミネーター）、リボソーム結合部位、ポリアデニル化シグナル等を含んでもよい。

【0024】複製開始点として、大腸菌ベクターに対して、例えばColE1、R因子、F因子由来のものが、酵母用ベクターに対して、例えば2 μ m DNA、ARS1由来のものが、哺乳類細胞用ベクターに対して、例えばSV40、アデノウイルス、ウシバビローマウイルス由来のものをを用いることができる。プロモーターは本発明のDNAをコードするmRNAの合成を指令するための調節配列であり、その代表的な例は、アデノウイルス又はSV40プロモーター、大腸菌lac又はtrpプロモーター、ファージラムダPLプロモーター、酵母用としてのADH、PHO5、GPD、PGK、AOX1プロモーター、蚕細胞用としての核多角体病ウイルス由来プロモーターである。

【0025】選択マーカーは、形質転換宿主細胞を選択するための表現型を宿主に付与するための遺伝子であり、その例として、大腸菌用ベクターには、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子等を、酵母用ベクターには、Leu2、Trp1、Ura3遺伝子等を、哺乳類細胞用ベクターには、ネオマイシン耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を挙げることができる。

【0026】ベクターは商業的に入手可能なものを使用することができるが、そのようなベクターには、例えば、細菌性のものではpQE70、pQE60、pQE-9（Qiagen）、pBluescript I I KS、ptrc99a、pKK223-3、pDR540、pRIT2T（Pharmacia）、pET-11a（Novagen）；及び真核性のものではpXT1、pSG5（Stratagene）、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL SV40（Pharmacia）がある。

【0027】本発明のDNAは任意の手段でベクター中に導入することができる。ベクターは、種々の制限部位をその内部にもつポリリンカーを含んでいるか、又は単一の制限部位を含んでいることが望ましい。ベクター中の特定の制限部位を特定の制限エンドヌクレアーゼによって切断し、その切断部位に本発明のDNAを挿入する。本発明のDNA及び調節配列を含む発現ベクターを適切な宿主細胞の形質転換又はトランスフェクションに用いて宿主細胞に本発明のヒトブラディオン蛋白質又はその類似体を発現、産生させることができる。

【0028】宿主細胞の例としては、細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌など；真菌細胞、例えばアスペルギルス属菌株など；酵母細胞、例えばパン酵母、メタノール資化性酵母など；昆虫細胞、例えばドロソフィラS2、スボドプテラSf9など；ヒト培養細胞を含む哺乳類細胞、例えばCHO、COS、BHK、3T3、C127などが挙げられる。形質転換又はトランスフェクションは、塩化カルシウム／塩化ルビジウム法、リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、電気穿孔法などの公知の方法で行うことができる。

【0029】本発明のヒト由来ブラディオン又はその類似体は、上記のように形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞をプロモーターの制御下において発現させ、産生した目的蛋白質を回収する。発現に際しては、宿主細胞を適切な細胞密度まで増殖又は成長させた後、プロモーターを温度シフト又は化学的誘発（IPTG等）手段によって誘発させ、細胞をさらに一定期間培養する。目的の蛋白質が細胞外に分泌される場合には培地から直接に、また、細胞内に存在する場合には物理的手段（超音波破壊、機械的破壊）若しくは化学的手段（リゾチームや細胞溶解剤）によって細胞を破壊した後に、目的の蛋白質を精製する。例えば蛋白質は、組換え細胞の培養培地又はその抽出液から、硫酸アンモニウム若しくはエタノール沈殿、酸抽出、アニオン若しくはカチオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、HPLC、電気泳動、クロマトフォーカシングなどの慣用の技術を組合わせて部分的に又は完全に精製することができる。

【0030】本発明のDNAを種々のヒト細胞株及び癌細胞株に遺伝子導入することによってブラディオン蛋白質の機能を調べた結果、前述の知見に加えて、次のことが明らかになった。（1）本発明のDNAを、未分化のヒト培養神経細胞であるヒト培養神経細胞NT2neuron（Stratagene製）にSuperfect試薬（Qiagen製）を用いて遺伝子導入し、過剰発現させると、18～24時間以内に細胞死を誘導した。（2）同様の方法で培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導した。（3）培養癌細胞

への遺伝子導入は α 型のみ細胞死を誘導し、 β 型では細胞死が観察されなかった。(4)細胞死に至る過程でブラディオ蛋白質は細胞質に存在して細胞内凝集体を形成し24時間以内でミトコンドリアに集積した。さらにまた、培養ヒト癌細胞を用いた研究により、ブラディオが大腸直腸癌細胞株及びメラノーマ(皮膚癌)細胞株への特異的発現が検出され、脳神経系以外の組織においても癌化に伴って特異的に機能発現していることが判明した。

【0031】以上の知見に基づいて、本発明のブラディオ蛋白質は、中枢の脳神経細胞における神経刺激伝達を介した非分裂状態での生存を可能にしていると考えられる。これは、遺伝子の過剰発現において細胞寿命の停止を指令し、また、 α 及び β 型の発現比率(正常脳神経細胞において10:1)を維持することが重要と考えられる。この発現比率の変化(例えば1:1)により、癌化を誘導することも示唆された。従って、ブラディオ蛋白質は、脳神経細胞の発生・分化後の長期にわたる非分裂状態のままの生存を決定づける細胞寿命制御・癌化制御因子として働くことと推定され、老化に伴う神経細胞の脱落のモニタリング、脳虚血やてんかん重積状態で発生する神経細胞壊死などの解明、中枢における神経細胞の生存機構、脳の病態の理解に有用であるほか、遺伝病の治療や新規医薬品の創製にも有用である。また、癌の遺伝子診断および遺伝子治療への応用も可能である。

【0032】したがって、本発明の蛋白質もしくはその断片、それらに対する抗体、又は本発明のDNAもしくはその断片を、癌(例えばヒト大腸がんやヒト皮膚癌)の検出もしくは診断、或いは細胞寿命制御・癌化制御のための治療に使用することができる。このような目的には、該蛋白質を単特異的に認識するポリクローナル又はモノクローナル抗体が有用である。抗体、特にモノクローナル抗体は診断、ワクチン、ドラッグデリバリーシステムなどに使用できる。抗体の作製に関しては、例えば松橋直ら、生物化学実験法15、免疫学実験入門(1982年)、学会出版センター;岩崎辰夫ら、単クローン抗体-ハイブリドーマとELISA-(1987年)、講談社サイエンティフィック等に記載される方法を使用できる。

【0033】ポリクローナル抗体は、本発明の蛋白質又はその断片を抗原とし、その抗原液とFreundの完全アジュバントとを混合して乳濁液を形成した後、ウサギ、マウス、ヤギ、ウシ、ウマ等の哺乳動物の皮下に注射し、約2週間後Freundの不完全アジュバントに乳濁させた抗原液を動物に同様に注射し、必要によりブーストし、採血することによって抗血清として得ることができる。さらに、抗血清を硫酸塩析、DEAEセルロースを用いるイオン交換クロマトグラフィーなどによってIgGを得、本発明の蛋白質又はその断片をCNBr活性化Sephadex若しくはSephacroseに結合させたアフィニティクロマトグラフィーにIgG画

分をアプライし、免疫反応により結合した目的の抗体を単特異的に精製することができる。

【0034】モノクローナル抗体は、上記と同様に調製した抗原-アジュバント乳濁液をマウス(BALB/c等)の腹腔内に注射しマウスを免疫し、脾臓を摘出し、脾臓細胞を得た後、この細胞をミエローマ細胞(X63、NS-1等)とポリエチレングリコール(PEG4000等)の存在下に融合させ、HAT培地で抗体産生ハイブリドーマを選択し、クローニング法か又はマウス腹腔内注射後の腹水から目的のモノクローナル抗体を得ることができる。また、Tengら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983), 80: 7308-7312、Kozborら、Immunology Today (1983), 4(3): 72-79に記載されるような公知の技術を用いてヒト化モノクローナル抗体を作製することも可能である。上記抗体を癌などの診断に用いる場合の免疫学的方法として、酵素免疫測定法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法などの慣用のイムノアッセイ法を使用できる。

【0035】さらに、本発明のDNA又はその断片をプローブ又はプライマーとして使用する場合、配列番号1(129~1943位)又は配列番号3(129~1562位)に示される塩基配列中の任意の連続する15個以上、好ましくは20個以上、さらに好ましくは30個以上のヌクレオチドからなるプローブ又はプライマーを自動DNA合成機を用いて作製し、アイソトープ、蛍光物質等で標識後に診断用プローブ又はPCRプライマーとして使用することができる。ハイブリダイゼーションを行なう場合の条件は、Sambrookら、Molecular Cloning (上掲)、F. M. Ausubelら、Short Protocols in Molecular Biology, Third Edition, John Wiley & Sonsに記載される条件を使用できる。

【0036】

【実施例】本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

<実施例1>ヒトブラディオをコードするcDNAのクローニング及び配列決定

初めに、真核細胞での発現のためのCMVプロモーターに接続できるプラスミドベクターpCMV SPORT1(Life Technologies社(米国))を用いてヒト成人脳のcDNAライブラリーを構築した。この時、成人脳は、米国の36歳のコーカサス系白人女性からの検体であり、Life Technologies社製のトリゾール試薬(商品名)にてmRNA(poly(A) RNA)を抽出、メッセージメーカー試薬(Life Technologies社)によりmRNA(poly(A) RNA)を精

製、スーパースクリプトプラスミドシステムにより二本鎖cDNA合成・ライブラリー構築を開始した。

【0037】上記で調製したmRNA (poly (A)

RNA) の3'末端にNot I プライマーアダプターを結合させた後、これを、逆転写酵素Super Script II 及びT4 DNAポリメラーゼを用い、定法に従い2本鎖cDNAを合成・調製した。次いで、cDNA鎖の5'末端にSal I アダプターを付加、3'末端を制限酵素Not I で処理して、制限酵素による切断部位Sal I -Not I を両端に持つcDNA断片とした。このcDNAをゲルろ過クロマトグラフィーによりサイズ毎に分離し、1 kb以上の大きさをもったcDNAを選択、分取した。得られたcDNA断片群を、同じくSal I -Not I で切断されたプラスミドベクターpCMV SPORT1に挿入して、定法により環状プラスミドを作製した。これを、大腸菌DH12S細胞 (Life Technologies社) にエレクトロポレーション法を用いて導入し、増殖させ、ライブラリーを構築した。

【0038】この大腸菌群を抗生物質アンピシリン添加LB寒天培地上に増殖させてコロニーを形成した。このコロニーの上に、10 mM IPTGで処理したバイオダインAナイロン膜 (Pall社、米国) を密着させて37℃で2時間静置、その後ナイロン膜を脳神経細胞を特異的に認識する抗体CE5 [Nature, 296, 34-38, (1982)] に反応させ、picoBlue™ Immunoscreening Kit (STRATAGENE, 米国) にて陽性クローンを選別した。

【0039】得られた陽性クローンよりプラスミドDNAを採取し、それを³²P標識プローブとしてヒト各臓器特異的mRNA転写ナイロン膜 (MTN blot, Clontech社) にハイブリダイズさせ、脳特異的かどうかを検定した。cDNAは、シークエンス解析により塩基配列を決定し、遺伝子バンクによる相同性をもつ他の配列と比較検討し、全く新規配列と認められたもののみを目的に添うものとして遺伝子バンクに登録した。かくして決定されたαブラディオンのcDNAの塩基配列を配列表の配列番号1 (ジーンバンク登録ナンバー: AB002110) に示した。コーディング領域は129~1943位であった。また、この塩基配列に基いて決定されたαブラディオンのアミノ酸配列を配列番号2に示した。αブラディオンのcDNAを含むDNAは、平成10年7月14日に工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県、つくば市) にFERMP-16897として寄託された。

【0040】上記αブラディオンのcDNAの配列を基に、5'末端プライマー (下記) を合成し、関連遺伝子の系統的探索を行った。そのために、GeneTrap per Positive Selection sys

tem (Life Technologies社製)

を用いて、合成オリゴヌクレオチドとマグネットビーズによる上記遺伝子ライブラリーのスクリーニングを行った。用いたオリゴヌクレオチドの配列は、5' -ctgagcaagttcgtgaaggatttc-3' (配列番号5) 及び5' -cagtcctctgacacaccagcagta-3' (配列番号6) である。その結果βブラディオンのと命名する遺伝子が検出され、その塩基配列を配列表の配列番号3 (ジーンバンク登録ナンバー: AB008753) に示した。コーディング領域は129~1562位であった。この塩基配列に基いて決定されたβブラディオンのアミノ酸配列を配列番号4に示した。

【0041】<実施例2> α及びβブラディオンの特徴付け

(1) ヒドロパシー分析

実施例1で決定されたα及びβブラディオンの蛋白質のアミノ酸配列について、Kyte-Doolittle法 (Kyte, J. とDoolittle, R. F.

J., J. Mol. Biol. (1982), 157

(1): 105-132) によるヒドロパシー分析を行った。この分析法は蛋白質のアミノ酸配列からその高次構造を推定する方法の1つであり、蛋白質中の疎水性及び親水性部分の分布を知ることができ、これに基いて立体構造の有無や膜貫通ドメインの存在を推定することが可能である。図1a、図1bには、分析結果を示しているが、同時にヒト由来のインターロイキン (IL) 2レセプター、IL3レセプター、IL4レセプター及び成長ホルモンレセプターについての分析結果も比較のために示した。図から、成長ホルモン・サイトカインレセプター配列を有する蛋白質は、膜貫通部分 (左から3番目の枠 (赤色で示す)) である疎水基の集合部分 (計算式上プラスとして出る) 及びその前部の細胞質外部分

(左から2番目の枠 (青色で示す))、さらに後部の細胞質内部分 (左から4番目の枠 (緑色で示す)) に大別されることがわかる。これらの構造は各レセプターに共通であり、本発明のブラディオンの同様の構造を有することが判明した。ただし、ブラディオンは、疎水基部分であるシグナルペプチド (左から1番目の枠 (黄色で示す)) を有していない。結果として、本発明のブラディオンは膜蛋白質であり、そのアミノ酸配列において膜貫通部分 (一回) も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有することがわかった。

【0042】(2) ブラディオンの蛋白質の局在

ヒト各臓器特異的mRNA転写ナイロン膜 (MTN blot, Clontech社) へのハイブリダイゼーションにより、ヒト成人脳に強度の発現が認められ、他には心臓においてわずかな発現 (脳の10%以下) が認められるのみであった。他の臓器、ヒト胎児には発現されなかった。成人脳においては、上記α及びβタイプが発

現しており、その差は選択的スプライシングによって生じたものと考えられた。マウス脳にも相同遺伝子配列が存在するが、1種類のみであり、それはヒトの2種のタイプのうち、 β 型(94%の相同性)のみであった。

【0043】(3) α 及び β ブラディオン遺伝子の培養細胞への導入実験

α 及び β ブラディオンDNAをそれぞれヒト培養神経細胞 NT2 neuron (STRATAGENE 社)、すなわち未分化のヒト培養神経細胞、に Superfect 試薬 (QIAGEN, 米国) を用いて遺伝子導入し、過剰発現させた。結果を図 2 a, b, c に示す。

【0044】図 2 のパネル a には、 α (上段) 及び β (下段) ブラディオン遺伝子の遺伝子導入後 24 時間の標識像について、左に α (上段) 及び β (下段) ブラディオンの存在位置を、中にミトコンドリアの存在部位を、右に左と中のダブルイメージを示した。像はすべて共焦点レーザー顕微鏡によって観察された。その結果、 α ブラディオンはミトコンドリアに一致した存在(赤色+緑色で黄色く呈色する)を示し、 β ブラディオンでは一致しないことがわかった。

【0045】さらに、 α ブラディオン遺伝子導入後、18~24 時間以内に細胞死が誘導されるが、死に至る過程で α ブラディオンは細胞内凝集体を形成し、ミトコンドリアに集積することが示された。パネル b には、遺伝子導入後の表示の各時間における細胞像を示し、左がヒト培養細胞 NT2 neuron (STRATAGENE 社)、右がヒト癌細胞 HeLa である。その結果、どちらの細胞系列においても、細胞質内凝集体の形成と細胞死が認められた。この事実を確認するために、パネル b の細胞を用いて電子顕微鏡観察を行ったところ、パネル c に示されたように、プログラム細胞死(アポトーシス)に特異的なアポトーシス小体の存在が確認された。

【0046】(4) α 及び β ブラディオン遺伝子と癌との関連

α 及び β ブラディオン遺伝子は、正常の組織では、脳及びごく僅かに(脳の約 10%) 心臓でしか発現しないに

も拘らず、培養癌細胞での発現が認められた。結果を図 3 a、3 b、3 c に示した。図 3 a には、異なる培養ヒト癌細胞における α 及び β ブラディオン遺伝子の発現検定をノーザンブロッティングにより行った結果を示した。レーン 6 (皮膚癌細胞株 G361) 及びレーン 8 (大腸癌細胞株 SW480) にのみ特異的発現反応(シグナル)が認められた。

【0047】そこで、ヒト患者検体(病理組織標本)を用いて、発現の検定を検索したところ、図 3 b に示すとおり、10 検体の大腸癌(T1~T10; Adとして記載)、3 検体の皮膚癌(T11~T13; Muc、MMとして記載)において特異的発現が確認された。図 3 c には、その遺伝子発現確認を組織染像として示した。上記の結果は、 α 及び β ブラディオン並びにそれらをコードする遺伝子が、大腸癌や皮膚癌等の癌の腫瘍マーカーとして使用できることを示している。

【0048】

【発明の効果】本発明のブラディオン及びそれをコードする DNA は、中枢の脳神経細胞における神経刺激伝達を介した非分裂状態での生存を可能にしていると考えられる。これは、遺伝子の過剰発現において細胞寿命の停止を指令し、また、生体内では α 及び β 型の発現比率(正常脳神経細胞において 10:1)が維持されていると考えられる。この発現比率の変化(例えば 1:1)により、癌化を誘導することも示唆される。従って、ブラディオン及びそれをコードする DNA は、脳神経細胞の発生・分化後の長期に渡る非分裂状態のままの生存を決定づける、細胞寿命制御・癌化制御因子として働くと推定され、老化に伴う神経細胞の脱落のモニタリング、脳虚血やてんかん重積状態で発生する神経細胞壊死などの解明、中枢における神経細胞の生存機構、脳の病態の理解に有用である他、遺伝病の治療や新規医薬品の創製にも有用である。また、癌の遺伝子診断および遺伝子治療への応用も可能である。

【0049】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Director-General of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Human bradeion proteins, DNA encoding them, and use thereof

<130> 11900209

<160> 6

<170> Windows 95

<210> 1

<211> 2274

17

18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (129)...(1943)

<400> 1

```

gaaaggagca agccaggaag ccagacaaca acagcatcaa aacaaggctg tttctgtgtg      60
tgaggaaatt tgcctgggag ataaaattag acctagagct tttctgacagg gagtctgaag    120
cgtgggacat ggaccgttca ctgggatggc aaggggaattc tgtccctgag gacaggactg    180
aacctgggat caaccgtttc ctggaggaca ccacggatga tggagaactg agcaagttcg    240
tgaaggattt ctcaggaaat gcgagctgcc acccaccaga ggctaagacc tgggcatcca    300
ggccccaagt cccggagcca aggccccagg ccccgacct ctatgatgat gacctggagt    360
tcagaccccc ctgcgggccc cagtccctctg acaaccagca gtacttctgt gcccagccc    420
ctctcagccc atctgccagg ccccgagccc catgggggga gcttgatccc tatgattcct    480
ctgaggtaga gccctcagcc ctgccctttgc ctttcagtgg gctgctgcag gaagaccggg    540
ggcaggggagc aggaatgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtttgtgt    600
gtgtgtgtat ctgggaccca tttcagtcct gtgtcagccc tagctccaaa atatctgccc    660
ccaagggcac tggaaatttg cagtttcagc aagggcagga ggcccagctg gtggcctcag    720
atgggaactc acagaagtct ggcaactgct ttttaaggct ggggcaaagg cctgaaaggg    780
agagaagatt ggcgctgggt gccggggccc ctttggctcc tcaccgtgat gcattctgcc    840
ttcctgtcta ctacgatgac aaggagtatg tgggctttgc aacctcccc aaccaagtcc    900
accgaaagtc cgtgaagaaa ggctttgact ttacctcat ggtggcagga gagtctggcc    960
tgggcaaatc cacactgttc aatagcctct tctcactga tctgtaccgg gaccggaaac   1020
ttcttgggtg tgaagaaagg atcatgcaa ctgtggagat cactaagcat gcagtggaca   1080
tagaaaaaaa aggtgtgagg ctgoggctca ccattgtgga cacaccaagt tttggggatg   1140
cagtcaacaa cacagagtgt atgtctgact ggaagcctgt ggcaagaatac attgatcagc   1200
agtttgagca gtatttcga gacgagagtg gcctgaaccg aaagaacatc caagacaaca   1260
gggtgcactg ctgcctgtac ttcatctcac ccttcggcca tgggctccgg ccattggatg   1320
ttgaattcat gaaggccctg catcagcggg tcaacatcgt gcctatcctg gctaaggcag   1380
acacactgac acctcccga gttgaccaca agaaacgcaa aatccgggag gagattgagc   1440
attttggaat caagatctat caattccag actgtgactc tgatgaggat gaggacttca   1500
aatgacagga ccaagcccta aaggaaagca tccatttgc agtaattggc agcaacactg   1560
tagtagaggc cagagggcgg cgagttcggg gtcgactcta cccctggggc atcgtggaag   1620
tgaaaaaacc agggcactgc gactttgtga agctgaggac aatgctggta cgtaccaca   1680
tgcaggacct gaaggatgtg acacgggaga cacattatga gaactaccgg gcacagtga   1740
tccagagcat gaccgcctg gtggtgaatg aacggaatcg caagtatgac cagaagccag   1800
gacaaaagct gcagggggag atcccaagcc tagccttggg tgagaccaag ccctactttt   1860
gttcttctat aggccctggg ctcaatctaa gcgggtgctg gggtcctcct cgccctatca   1920
acccttttct ccccttagca aactgactcg ggaaagtggg accgacttcc ccatccctgc   1980
tgtccacca gggacagatc cagaaactga gaagcttacc ccagagaaag attaggagct   2040
gcggcggata cacgagatac tacaccaaat accaaaacag ataaaggaga actatttact   2100
ggctttcagc cctggatatt taaatctcct cctcttcttc ctgtccatgc cgccccctcc   2160
cagcaccagc tctgctcagg ccccttcagc tactgccact tcgacctaca tccctgctga   2220
ctgccagag actcagagga aataaagttt aataaatctg taggtggctt ctgg      2274

```

<210> 2

<211> 605

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Arg Ser Leu Gly Trp Gln Gly Asn Ser Val Pro Glu Asp Arg
 1 5 10 15
 Thr Glu Pro Gly Ile Asn Arg Phe Leu Glu Asp Thr Thr Asp Asp Gly
 20 25 30
 Glu Leu Ser Lys Phe Val Lys Asp Phe Ser Gly Asn Ala Ser Cys His
 35 40 45
 Pro Pro Glu Ala Lys Thr Trp Ala Ser Arg Pro Gln Val Pro Glu Pro
 50 55 60
 Arg Pro Gln Ala Pro Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Leu Glu Phe Arg Pro
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Pro Gln Ser Ser Asp Asn Gln Gln Tyr Phe Cys Ala Pro
 85 90 95
 Ala Pro Leu Ser Pro Ser Ala Arg Pro Arg Ser Pro Trp Gly Glu Leu
 100 105 110
 Asp Pro Tyr Asp Ser Ser Glu Val Glu Pro Pro Ala Leu Pro Leu Pro
 115 120 125
 Phe Ser Gly Leu Leu Gln Glu Asp Arg Gly Gln Gly Ala Gly Met Cys
 130 135 140
 Val Cys Val Cys Val Cys Val Cys Val Cys Val Phe Val Cys Val Cys
 145 150 155 160
 Ile Trp Asp Pro Phe Gln Ser Cys Val Ser Pro Ser Ser Lys Ile Ser
 165 170 175
 Ala Pro Lys Gly Thr Gly Asn Leu Gln Phe Gln Gln Gly Gln Glu Ala
 180 185 190
 Gln Leu Val Ala Ser Asp Gly Asn Ser Gln Lys Ser Gly Thr Ala Phe
 195 200 205
 Leu Arg Leu Gly Gln Arg Pro Glu Arg Glu Arg Arg Leu Ala Leu Gly
 210 215 220
 Ala Gly Ala Pro Leu Ala Pro His Arg Asp Ala Phe Cys Leu Pro Val
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Asp Asp Lys Glu Tyr Val Gly Phe Ala Thr Leu Pro Asn Gln
 245 250 255
 Val His Arg Lys Ser Val Lys Lys Gly Phe Asp Phe Thr Leu Met Val
 260 265 270
 Ala Gly Glu Ser Gly Leu Gly Lys Ser Thr Leu Val Asn Ser Leu Phe
 275 280 285
 Leu Thr Asp Leu Tyr Arg Asp Arg Lys Leu Leu Gly Ala Glu Glu Arg
 290 295 300
 Ile Met Gln Thr Val Glu Ile Thr Lys His Ala Val Asp Ile Glu Lys
 305 310 315 320
 Lys Gly Val Arg Leu Arg Leu Thr Ile Val Asp Thr Pro Ser Phe Gly
 325 330 335
 Asp Ala Val Asn Asn Thr Glu Cys Met Ser Asp Trp Lys Pro Val Ala
 340 345 350
 Glu Tyr Ile Asp Gln Gln Phe Glu Gln Tyr Phe Arg Asp Glu Ser Gly
 355 360 365
 Leu Asn Arg Lys Asn Ile Gln Asp Asn Arg Val His Cys Cys Leu Tyr

21

22

370 375 380
 Phe Ile Ser Pro Phe Gly His Gly Leu Arg Pro Leu Asp Val Glu Phe
 385 390 395 400
 Met Lys Ala Leu His Gln Arg Val Asn Ile Val Pro Ile Leu Ala Lys
 405 410 415
 Ala Asp Thr Leu Thr Pro Pro Glu Val Asp His Lys Lys Arg Lys Ile
 420 425 430
 Arg Glu Glu Ile Glu His Phe Gly Ile Lys Ile Tyr Gln Phe Pro Asp
 435 440 445
 Cys Asp Ser Asp Glu Asp Glu Asp Phe Lys Leu Gln Asp Gln Ala Leu
 450 455 460
 Lys Glu Ser Ile Pro Phe Ala Val Ile Gly Ser Asn Thr Val Val Glu
 465 470 475 480
 Ala Arg Gly Arg Arg Val Arg Gly Arg Leu Tyr Pro Trp Gly Ile Val
 485 490 495
 Glu Val Glu Asn Pro Gly His Cys Asp Phe Val Lys Leu Arg Thr Met
 500 505 510
 Leu Val Arg Thr His Met Gln Asp Leu Lys Asp Val Thr Arg Glu Thr
 515 520 525
 His Tyr Glu Asn Tyr Arg Ala Gln Cys Ile Gln Ser Met Thr Arg Leu
 530 535 540
 Val Val Asn Glu Arg Asn Arg Lys Tyr Asp Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 545 550 555 560
 Trp Gln Gly Glu Ile Pro Ser Leu Ala Leu Gly Glu Thr Lys Pro Tyr
 565 570 575
 Phe Cys Ser Ser Ile Gly Pro Gly Leu Asn Leu Ser Gly Cys Trp Gly
 580 585 590
 Pro Pro Arg Leu Ile Asn Pro Phe Leu Pro Leu Ala Asn
 595 600 605

<210> 3

<211> 1735

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> mat_peptide

<222> (129)···(1562)

<400> 3

gaaaggagca agccaggaag ccagacaaca acagcatcaa aacaaggctg tttctgtgtg 60
 tgaggaactt tgccctgggag ataaaattag acctagagct tttctgacagg gagtctgaag 120
 cgtgggacat ggaccgttca ctgggatggc aagggaattc tgtccctgag gacaggactg 180
 aagctgggat caagcgtttc ctggaggaca ccacggatga tggagaactg agcaagttcg 240
 tgaaggattt ctcaggaaat gcgagctgcc acccaccaga ggctaagacc tgggcatcca 300
 ggccccaagt ccgggagcca agggcccagg ccccgacat ctatgatgat gacctggagt 360
 tcagaccccc ctgcgggccc cagtcctctg acaaccagca gtacttctgt gcccagccc 420
 ctctcagccc atctgccagg ccccgagcc catggggcaa gcttgatccc tatgattcct 480
 ctgaggatga caaggagtat gtgggctttg caaccctccc caaccaagtc caccgaaagt 540
 ccgtgaagaa aggccttgac ttaccctca tggtggcagg agagtctggc ctgggcaaat 600

23

24

```

ccacacttgt caatagcctc ttctcactg atctgtaccg ggaccggaaa ctctcttggtg 660
ctgaagagag gatcatgcaa actgtggaga tctaagca tgcagtggac atagaagaga 720
aggggtgtgag gctgcggctc accattgtgg acacaccagg ttttggggat gcagtcaaca 780
acacagagtg ctggaagcct gtggcagaat acattgatca gcagtttgag cagtatttcc 840
gagacgagag tggcctgaac cgaaagaaca tccaagacaa caggggtgcac tgcctcctgt 900
acttcatctc acccttcggc catgggctcc ggccattgga tgtgaattc atgaaggccc 960
tgcacagcgg ggtcaacatc gtgcctatcc tggctaaggc agacacactg acacctcccg 1020
aagtggacca caagaaacgc aaaatccggg aggagattga gcattttgga atcaagatct 1080
atcaattccc agactgtgac tctgatgagg atgaggactt caaattgcag gaccaagccc 1140
taaaggaaag catcccattt gcagtaattg gcagcaacac ttagtagag gccagagggc 1200
ggcgagtgcg gggtcgactc taccctggg gcacgtgga agtggaac ccagggcact 1260
gcgactttgt gaagctgagg acaatgctgg tacgtacca catgcaggac ctgaaggatg 1320
tgacacggga gacacattat gagaactacc gggcacagt catccagagc atgacccgcc 1380
tggtggtgaa ggaacggaat cgacaacaa tgactcggga aagtgtgacc gacttcccca 1440
tccctgctgt cccaccaggg acagatccag aaactgagaa gcttatccga gagaagatg 1500
aggagctgcg gcgatgcag gagatgctac aaaaataca aaaacagatg aaggagaact 1560
attaactggc tticagccct ggatatttaa atctcctcct ctcttccctg tccatgccgg 1620
cccctcccag caccagctct gctcaggccc cttcagctac tgccacttcg cctaacatcc 1680
ctgctgactg cccagagact cagaggaaat aaagttaaat aaatctgtag gtggc 1735

```

<210> 4

<211> 478

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Asp Arg Ser Leu Gly Trp Gln Gly Asn Ser Val Pro Glu Asp Arg
  1             5             10            15
Thr Glu Ala Gly Ile Lys Arg Phe Leu Glu Asp Thr Thr Asp Asp Gly
          20             25             30
Glu Leu Ser Lys Phe Val Lys Asp Phe Ser Gly Asn Ala Ser Cys His
          35             40             45
Pro Pro Glu Ala Lys Thr Trp Ala Ser Arg Pro Gln Val Pro Glu Pro
          50             55             60
Arg Pro Gln Ala Pro Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Leu Glu Phe Arg Pro
          65             70             75             80
Pro Ser Arg Pro Gln Ser Ser Asp Asn Gln Gln Tyr Phe Cys Ala Pro
          85             90             95
Ala Pro Leu Ser Pro Ser Ala Arg Pro Arg Ser Pro Trp Gly Lys Leu
          100            105            110
Asp Pro Tyr Asp Ser Ser Glu Asp Asp Lys Glu Tyr Val Gly Phe Ala
          115            120            125
Thr Leu Pro Asn Gln Val His Arg Lys Ser Val Lys Lys Gly Phe Asp
          130            135            140
Phe Thr Leu Met Val Ala Gly Glu Ser Gly Leu Gly Lys Ser Thr Leu
          145            150            155            160
Val Asn Ser Leu Phe Leu Thr Asp Leu Tyr Arg Asp Arg Lys Leu Leu
          165            170            175
Gly Ala Glu Glu Arg Ile Met Gln Thr Val Glu Ile Thr Lys His Ala
          180            185            190

```

25
 Val Asp Ile Glu Glu Lys Gly Val Arg Leu Arg Leu Thr Ile Val Asp
 195 200 205
 Thr Pro Gly Phe Gly Asp Ala Val Asn Asn Thr Glu Cys Val Lys Pro
 210 215 220
 Val Ala Glu Tyr Ile Asp Gln Gln Phe Glu Gln Tyr Phe Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Ser Gly Leu Asn Arg Lys Asn Ile Gln Asp Asn Arg Val His Cys Cys
 245 250 255
 Leu Tyr Phe Ile Ser Pro Phe Gly His Gly Leu Arg Pro Leu Asp Val
 260 265 270
 Glu Phe Met Lys Ala Leu His Gln Arg Val Asn Ile Val Pro Ile Leu
 275 280 285
 Ala Lys Ala Asp Thr Leu Thr Pro Pro Glu Val Asp His Lys Lys Arg
 290 295 300
 Lys Ile Arg Glu Glu Ile Glu His Phe Gly Ile Lys Ile Tyr Gln Phe
 305 310 315 320
 Pro Asp Cys Asp Ser Asp Glu Asp Glu Asp Phe Lys Leu Gln Asp Gln
 325 330 335
 Ala Leu Lys Glu Ser Ile Pro Phe Ala Val Ile Gly Ser Asn Thr Val
 340 345 350
 Val Glu Ala Arg Gly Arg Arg Val Arg Gly Arg Leu Tyr Pro Trp Gly
 355 360 365
 Ile Val Glu Val Glu Asn Pro Gly His Cys Asp Phe Val Lys Leu Arg
 370 375 380
 Thr Met Leu Val Arg Thr His Met Gln Asp Leu Lys Asp Val Thr Arg
 385 390 395 400
 Glu Thr His Tyr Glu Asn Tyr Arg Ala Gln Cys Ile Gln Ser Met Thr
 405 410 415
 Arg Leu Val Val Lys Glu Arg Asn Arg Asn Lys Leu Thr Arg Glu Ser
 420 425 430
 Gly Thr Asp Phe Pro Ile Pro Ala Val Pro Pro Gly Thr Asp Pro Glu
 435 440 445
 Thr Glu Lys Leu Ile Arg Glu Lys Asp Glu Glu Leu Arg Arg Met Asp
 450 455 460
 Glu Met Leu His Lys Ile Gln Lys Gln Met Lys Glu Asn Tyr
 465 470 475

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is a 5'-end primer synthesized based on
 the nucleotide sequence of cDNA for alpha-bradeion.

<400> 5

ctgagcaagt tcgtgaagga ttic

24

<210> 6

27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This sequence is a 5'-end primer synthesized based on the nucleotide sequence of cDNA for alpha-bradeion.

<400> 6

cagtcctctg acaaccagca gta

【図面の簡単な説明】

【図1a】この図は、 α ブラディオンの疎水性、親水性部分の分布を、IL2、IL3、IL4の各レセプター、成長ホルモンレセプターと比較して示したKyte-Doolittle法によるヒドロパシー分析の結果を示す写真である。

【図1b】この図は、 α ブラディオンの疎水性、親水性部分の分布を、IL2、IL3、IL4の各レセプター、成長ホルモンレセプターと比較して示したKyte-Doolittle法によるヒドロパシー分析の結果を示す写真である（図1aのつづき）。

【図2】この図は、 α 及び β ブラディオン遺伝子を培養NT2neuron（未分化のヒト神経細胞）及びHeLa細胞に導入し過剰発現させたときの、共焦点レーザー顕微鏡による標識像（パネルaの場合NT2neuron；パネルbの場合NT2neuronとHeLa）、並びに、パネルbの細胞（18hrsと24hrs）についての電顕像（パネルc）を示す写真である。パネルa中、EGFP（Enhanced Green Fluorescent Protein；Clontech社製）によるブラディオン遺伝子の存在部位を、Mitochondriaはミトコンドリアにおけるブラディオン遺伝子の存在部位を、Overlayは左の標識像と中の標識像を重ね合わせた像をそれぞれ示している。

【図3a】この図は、ヒト癌細胞株における α 及び β ブラディオン遺伝子の等量発現を示す写真である。放射性標識ブラディオン遺伝子を用いたノーザンブロット解析の結果を示す。レーン1は、多発骨髄球性白血病（polymyelocytic leukemia），HL60；レーン2は、HeLaS3；レーン3は、慢性ミオロジナス白血病（chronic myelogenous

28

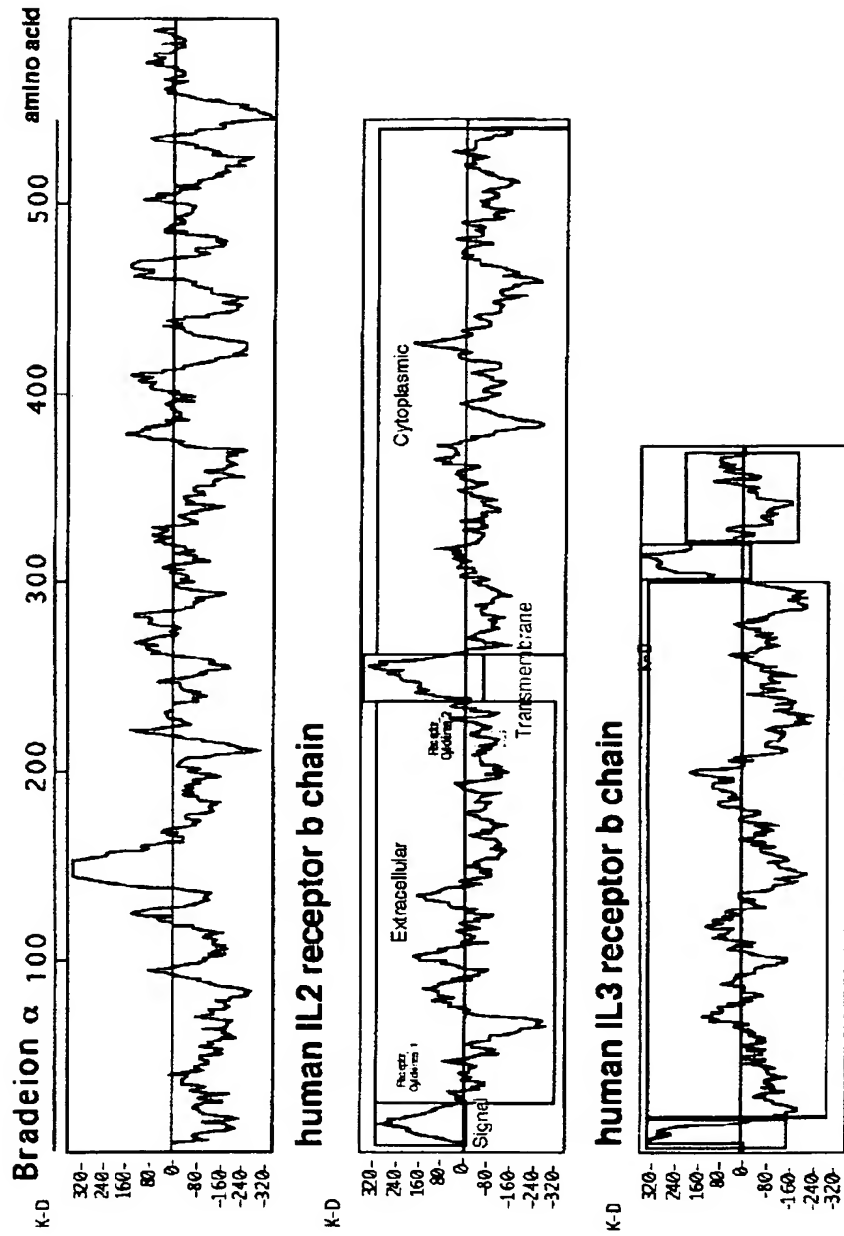
23

us leukemia），K-562；レーン4は、リンパ芽球性白血病（lymphoblastic leukemia），MOLT-4；レーン5は、バーキットリンパ腫（Burkitt's lymphoma），Raji；レーン6は、大腸癌（colorectal adenocarcinoma），SW480SW48021，22；レーン7は、肺癌（lung carcinoma），A549；レーン8は、黒色腫（melanoma），G361である。また陽性コントロールとして、ベータアクチン遺伝子を用いたノーザンブロット解析の結果を下に示す。

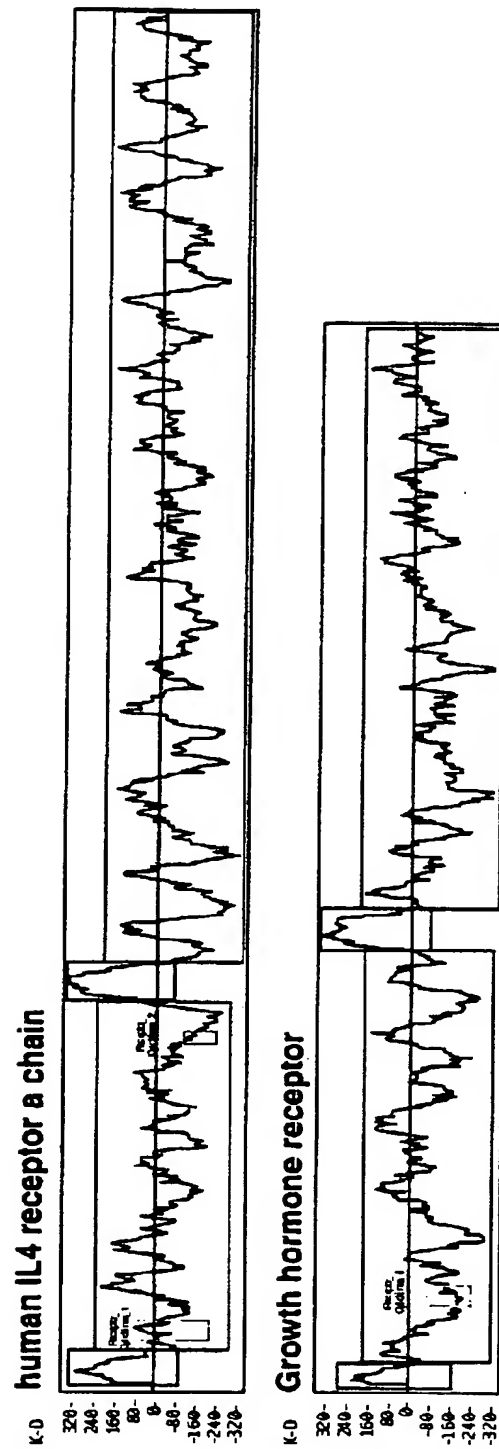
【図3b】この図は、大腸癌患者検体におけるブラディオン遺伝子の癌特異的発現を示す。RT-PCR法、insituハイブリダイゼーション法による大腸癌（T1～T10）、皮膚癌（T11～T13）、正常細胞（N1～N2）におけるブラディオン遺伝子発現の測定結果を示す。図中、*は、 α 及び β ブラディオン遺伝子双方が検出され、遺伝子内変異は見られなかった場合であり、NDは、RNAの変質により検出不能であったことを示し、Ad（well）は、アデノカルシノーマ（分化型）を示し、Ad（mod）は、アデノカルシノーマ（中度分化型）を示し、Mucは、ムチン分泌型アデノカルシノーマを示し、MMは、悪性黒色腫を示す。K-ras遺伝子のコドン12の標準遺伝子配列はGGTであるが、その遺伝子内変異をもつものを記載した。この突然変異は染色体1対のうち片方で生じたものである。

【図3c】この図は、ヒト癌組織検体のinsituハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。図3bにおけるT13、T8についての組織染色図（Antisense：陽性、Sense：陰性対照）を示す。

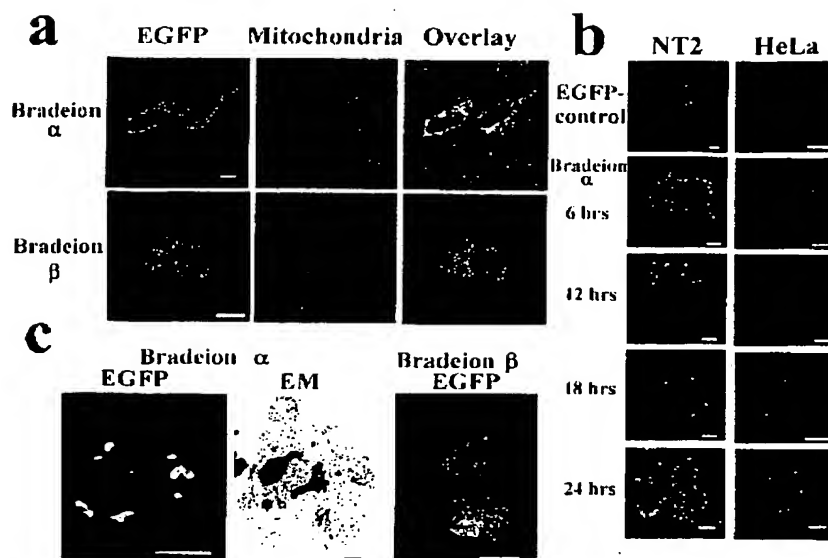
【図1 a】



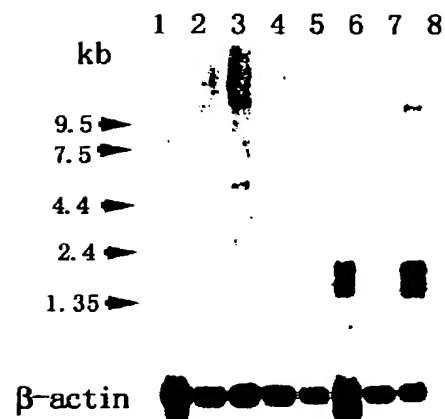
【図 1 b】



【図2】



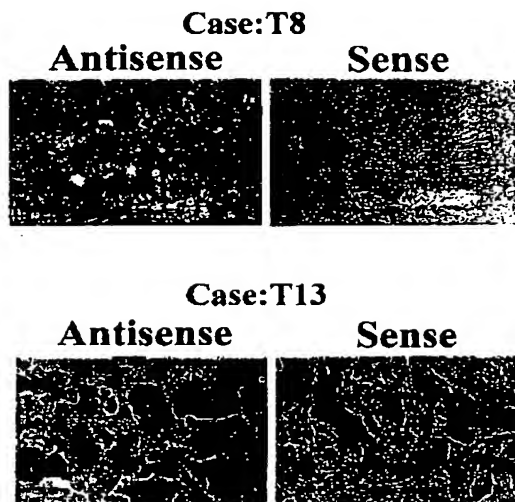
【図3 a】



【図3 b】

Case No.	Age/sex	Hist. type	Dukes' stage	K-ras (codon 12)	Bradeion RT-PCR hybridization	In situ
T1	81/M	Ad(mod)	A	-	ND	+
T2	51/F	Ad(mod)	B	-	ND	+
T3	71/M	Ad(mod)	C	-	++	+
T4	70/M	Ad(mod)	C	-	ND	+
T5	40/M	Ad(mod)	C	-	ND	+
T6	75/M	Ad(mod)	A	-	ND	+
T7	71/F	Ad(well)	B	GTT	++	+
T8	56/M	Ad(well)	B	-	ND	+
T9	70/F	Ad(well)	C	GCT	++	+
T10	54/M	Ad(well)	C	GAT	ND	+
T11	73/F	MM	A	-	ND	+
T12	63/M	Muc	A	-	++	+
T13	68/F	Muc	C	GAT	++	+
N1	54/M	normal	-	-	-	-
N2	81/M	normal	-	-	-	-

【図3 c】



【手続補正書】

【提出日】平成10年11月17日(1998.11.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】図面

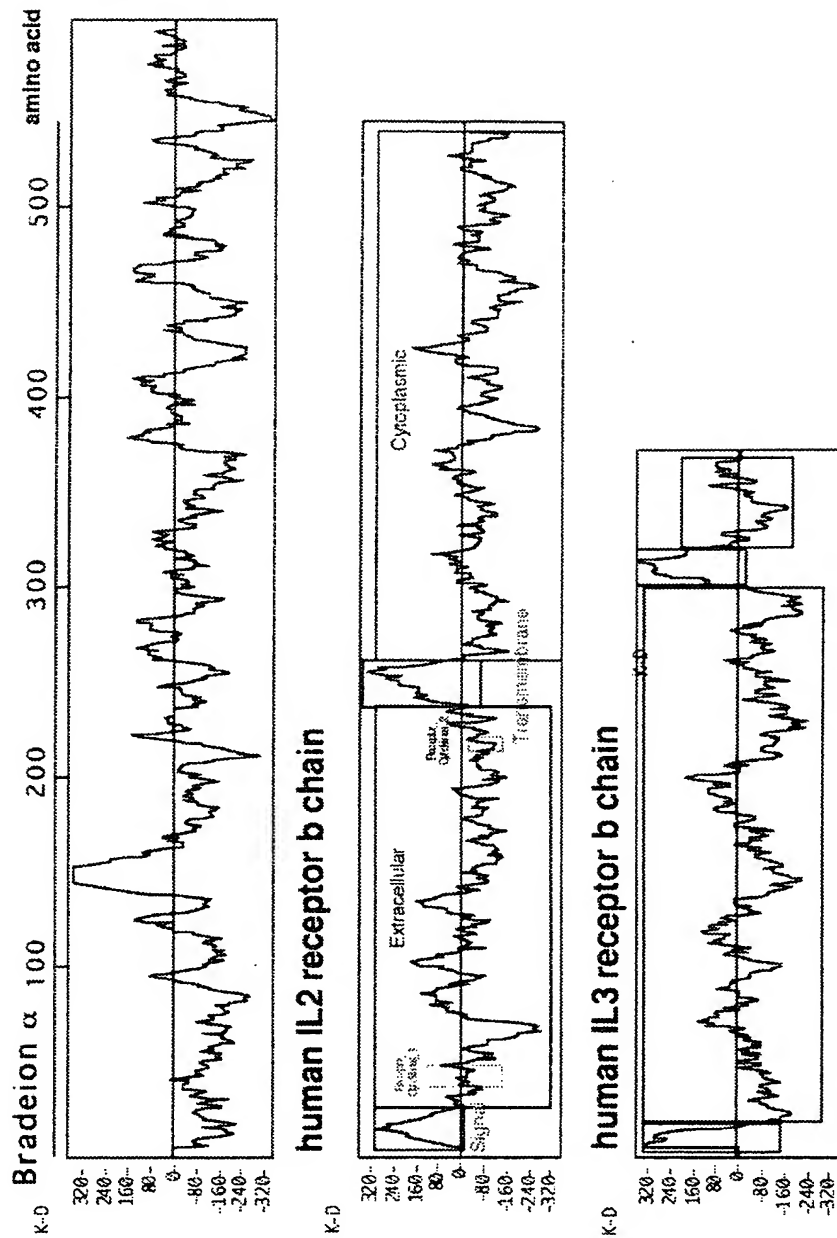
【補正対象項目名】図1 a

【補正方法】変更

【補正内容】

【図1 a】

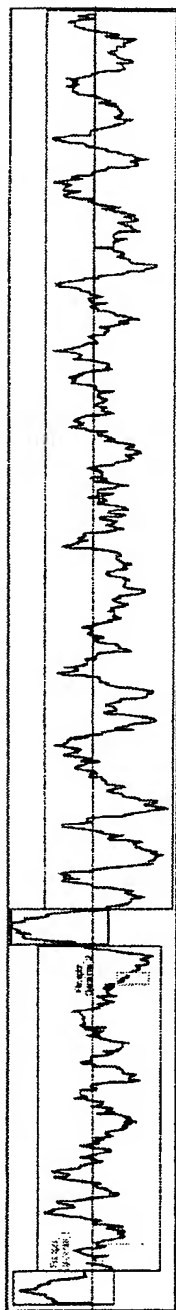
図面代用写真 (カラー)



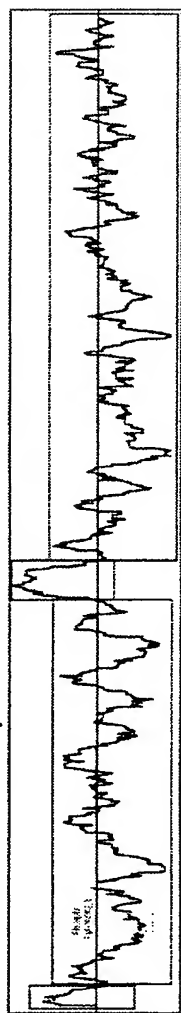
【手続補正2】
 【補正対象書類名】図面
 【補正対象項目名】図1 b
 【補正方法】変更
 【補正内容】
 【図1 b】

図面代用写真 (カラー)

human IL4 receptor a chain

K-D
320-
240-
160-
80-
0-
-80-
-160-
-240-
-320-

Growth hormone receptor

K-D
320-
240-
160-
80-
0-
-80-
-160-
-240-
-320-

【手続補正 3】

【補正対象書類名】図面

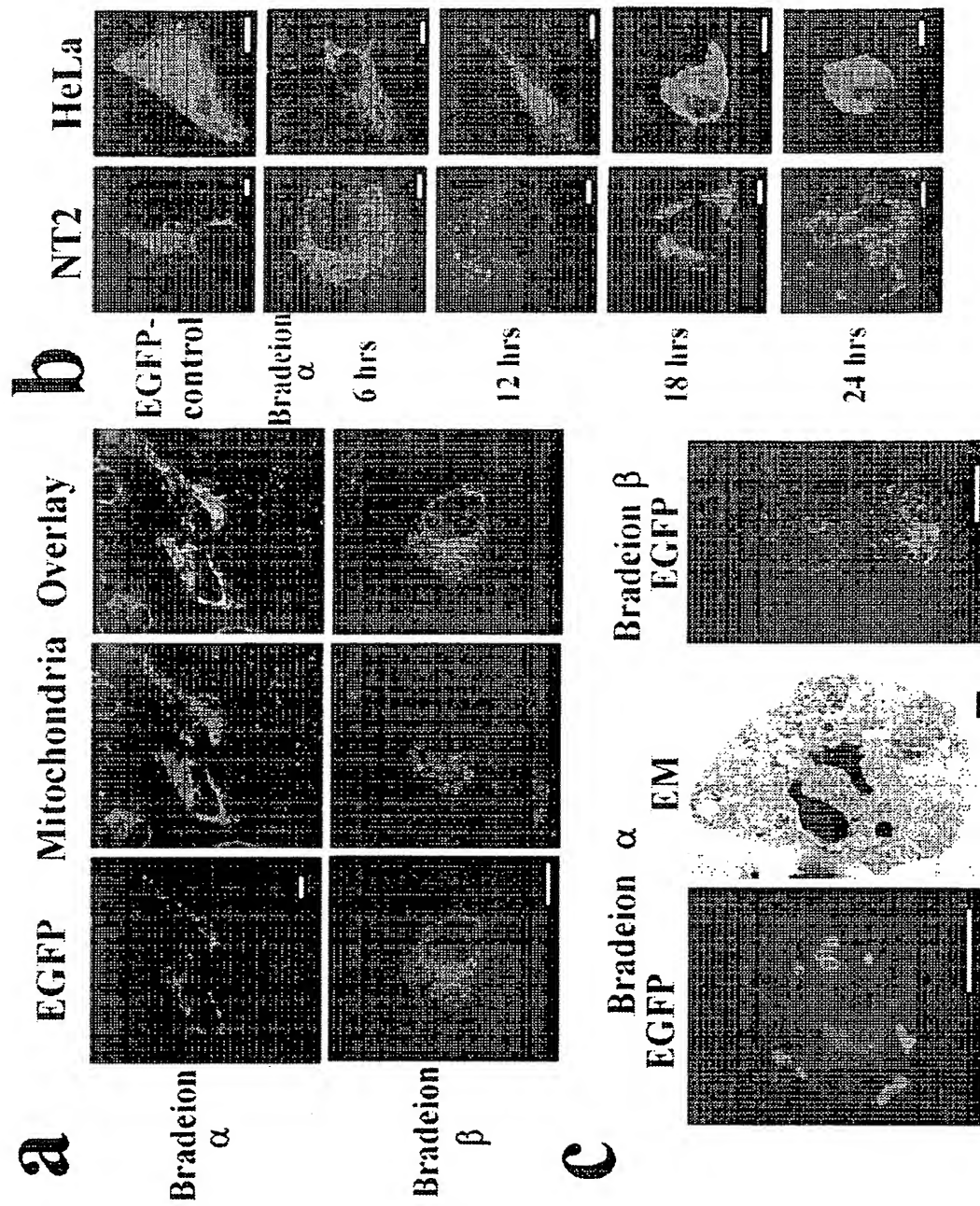
【補正対象項目名】図 2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 2】

図面代用写真 (カラー)



【手続補正 4】

【補正対象書類名】図面

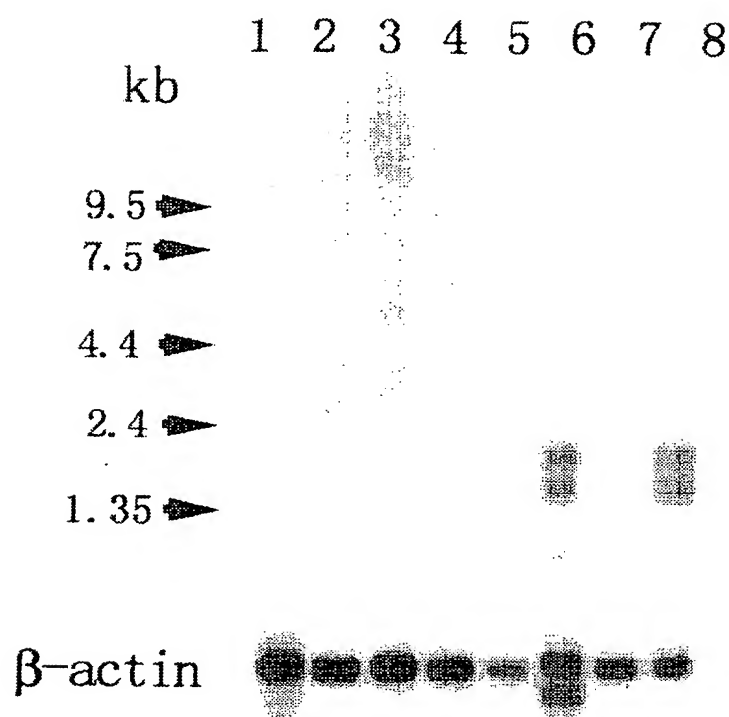
【補正対象項目名】図 3 a

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 3 a】

図面代用写真



【手続補正 5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 c

【補正方法】変更

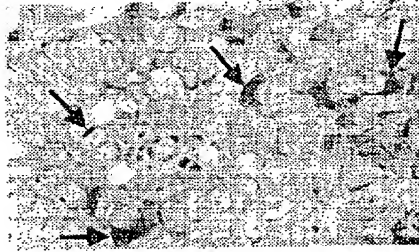
【補正内容】

【図 3 c】

図面代用写真 (カラー)

Case:T8

Antisense



Sense



Case:T13

Antisense



Sense



【手続補正書】

【提出日】平成11年11月1日(1999.11.

1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号2または配列番号4に示すアミノ酸配列からなり、且つ、以下の性質：

(1) 膜蛋白質である、(2) Kyte-Doolittle法によるヒドロパシー分析により、膜貫通部分(一回)も含めてインターロイキンレセプターに特徴的な構造を有する、(3) ヒト成人脳に強度の発現が認められ、心臓において脳の10%以下の発現が認められ、その他の臓器やヒト胎児には発現されない、(4) 未分化のヒト培養神経細胞に過剰発現させると、細胞死を誘導する、(5) 培養ヒト正常細胞に過剰発現させると、老化・分裂停止を誘導する、(6) 細胞死に至る過程で細胞質に存在して細胞内凝集体を形成し、24時間以内でミトコンドリアに集積する、及び(7) ヒト大

腸癌細胞株又は皮膚癌細胞株で特異的に発現されるを有するヒト由来ブラディオン蛋白質、あるいは、配列番号2または配列番号4に示す該アミノ酸配列において少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列を有し、且つ、ヒト由来ブラディオン蛋白質と実質的に同等の性質を有する、天然由来のまたはDNA組換え技術により得ることができるヒト由来ブラディオン蛋白質の類似体。

【請求項2】 培養癌細胞にブラディオン蛋白質又はその類似体をコードするDNAを遺伝子導入すると細胞死を誘発する、請求項1に記載のブラディオン蛋白質又はその類似体。

【請求項3】 請求項1または2に記載のブラディオン蛋白質もしくはその類似体をコードする塩基配列を含むDNA。

【請求項4】 配列番号1の129位から1943位までの塩基配列からなる、請求項3に記載のDNA。

【請求項5】 配列番号3の129位から1562位までの塩基配列からなる、請求項3に記載のDNA。

【請求項6】 配列番号1の129～1943位に示す塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下で

ハイブリダイズする、請求項 3 に記載の DNA。

【請求項 7】 配列番号 3 の 129～1562 位に示す塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、請求項 3 に記載の DNA。

【請求項 8】 請求項 3～7 のいずれかに記載の DNA を含むベクター。

【請求項 9】 請求項 8 に記載のベクターで形質転換もしくはトランスフェクションされた宿主細胞。

【請求項 10】 原核又は真核細胞である、請求項 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 11】 請求項 1 または 2 に記載のブラディオオン蛋白質またはその類似体と免疫反応性である抗体。

【請求項 12】 癌の検出における、請求項 3～7 のい

ずれかに記載の DNA、または 15 個以上の連続するスクレオチドの配列からなる該 DNA の断片、または請求項 11 に記載の抗体の使用。

【請求項 13】 癌がヒト大腸癌またはヒト皮膚癌である、請求項 12 に記載の使用。

【請求項 14】 検出がハイブリダイゼーション又はイムノアッセイによって行われる、請求項 12 または 13 に記載の使用。

【請求項 15】 DNA の断片が、配列番号 1 の 129 位～1943 位の塩基配列または配列番号 3 の 129 位～1562 位の塩基配列において 15 個以上の連続するスクレオチドからなる配列を有する、請求項 12 に記載の使用。

【手続補正書】

【提出日】平成 12 年 2 月 21 日（2000. 2. 21）

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0046

【補正方法】変更

【補正内容】

【0046】（4） α 及び β ブラディオオン遺伝子と癌との関連

α 及び β ブラディオオン遺伝子は、正常の組織では、脳及びごく僅かに（脳の約 10%）心臓でしか発現しないにも拘らず、培養癌細胞での発現が認められた。結果を図 3 a、3 b、3 c に示した。図 3 a には、異なる培養ヒト癌細胞における α 及び β ブラディオオン遺伝子の発現検定をノーザンブロッティングにより行なった結果を示した。レーン 8（皮膚癌細胞株 G361）及びレーン 6（大腸癌細胞株 SW480）にのみ特異的発現反応（シグナル）が認められた。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード（参考）
C 1 2 N	1/21	C 1 2 N	1/21
	5/10	C 1 2 P	21/02
C 1 2 P	21/02		21/08
	21/08	C 1 2 Q	1/68
C 1 2 Q	1/68	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/53		33/566
	33/566		33/574
	33/574		33/577
	33/577	C 1 2 N	5/00
/(C 1 2 N	15/09		
C 1 2 R	1:91)		

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA43 BA63 CA04
DA06 EA04 GA05 GA11 HA14
HA15 HA17
4B063 QA01 QA19 QO08 QO43 QR36
QS25 QS34 QX02
4B064 AG20 AG26 AG27 CA02 CA10
CA19 CA20 CC24 DA14
4B065 AA26X AA90X AA92X AA93Y
AB01 AB05 BA02 CA24 CA25
CA44 CA46
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA45
DA50 DA75 DA76 DA86 EA51
FA74